

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE ER272
SOBRE LA NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO DE RATONES
ADULTOS**

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ



Alumno: Jesús Rubio Úbeda

Tutora: Dra. Carmen Castro González

Cotutor: Samuel Domínguez García

Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública

Área de Fisiología

CÁDIZ, 2019

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Neurogénesis	7
1.2 Células madre neurales	7
1.3 Nichos neurogénicos	8
1.4 Reposición neuronal fisiológica en el cerebro adulto	9
1.5 PKC	11
1.6 Regulación de la actividad de PKC	12
1.7 Activación de PKC por diterpenos	13
1.8 Vía de administración intracerebroventricular	13
1.9 Líquido cefalorraquídeo y Barrera sangre-LCR	14
1.10 Barrera hemato-encefálica	16
1.11 Vía de administración intranasal	18
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	21
4.1 Objetivo generales	21
4.2 Objetivos específicos	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Diseño del estudio	21
5.2 Animales de experimentación	21
5.3 Tamaño muestral	21
5.4 Procesamiento cerebral	22
5.5 Inmunohistoquímica	22
5.6 Criterios de inclusión y exclusión	23
5.7 Variables que se estudiarán	24
5.8 Recogida de datos	24
5.9 Análisis de datos	24
5.10 Limitaciones del estudio	25
6. ASPECTOS ÉTICOS	25
7. RESULTADOS	27

7.1 La administración intranasal de ER272 induce la proliferación de progenitores en la SVZ _____	27
7.2 La administración intranasal de ER272 estimula la formación de neuroblastos en la SVZ _____	27
7.3 La administración intranasal de ER272 no estimula la formación de glioblastos en la SVZ _____	29
7.4 La administración intranasal de ER272 no estimula la proliferación de progenitores en el DG del hipocampo _____	31
7.5 La administración intranasal de ER272 estimula la formación de neuroblastos en el DG del hipocampo _____	31
7.6 La administración intranasal de ER272 no estimula la formación de glioblastos en el DG del hipocampo _____	33
8. DISCUSIÓN _____	35
9. CONCLUSIONES _____	38
10. BIBLIOGRAFÍA _____	39
11. ANEXO _____	43

ABREVIATURAS

BHE: Barrera hemato-encefálica

BSLCR: Barrera sangre-LCR

BrdU: Bromodesoxiuridina

DAG: Diacilglicerol

DCX: Doblecortina

DG: Giro dentado del hipocampo

DNE: Neuroepitelio dentado

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

HCl: Ácido clorhídrico

ICV: Inyección intracerebroventricular

LCR: Líquido cefalorraquídeo

NPC: Célula progenitora neural indiferenciada

NSC: Célula madre neural

NVU: Unidad neurovascular

OB: Bulbo olfatorio

OSN: Neurona sensitiva del nervio olfatorio

PBS: Tampón fosfato salino

PC: Plexos coroideos

PFA: Paraformaldehído

PMA: 13-O-acetil-12-O-miristilforbol

PKC: Proteína kinasa C

RTK: Receptor tirosin-kinasa

SGZ: Región subgranular

SNC: Sistema nervioso central

SVZ: Región subventricular

VZ: Zona ventricular embrionaria

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. Las enfermedades neurológicas de mayor prevalencia y relevancia social están causadas por una pérdida irreversible de neuronas en distintas zonas del SNC. La mayoría de estas enfermedades son de tipo neurodegenerativo, es decir, se producen como consecuencia de la muerte neuronal. Este tipo de patologías no tienen actualmente un tratamiento eficaz, siendo la búsqueda de alternativas terapéuticas uno de los principales desafíos de la neurociencia actual. El descubrimiento relativamente reciente de la existencia de reposición neuronal a partir de células madre neurales (NSC) en el sistema nervioso central (SNC) adulto ha supuesto un nuevo enfoque en el desarrollo de terapias para reemplazar las neuronas perdidas.

En el cerebro adulto se generan neuronas a partir de células madre neurales; la neurogénesis se produce en condiciones fisiológicas en dos regiones neurogénicas principales: el giro dentado del hipocampo (DG) y la región subventricular (SVZ). En condiciones patológicas se estimula la neurogénesis en estas regiones y células con características de progenitores neurales migran y se dirigen hacia las zonas dañadas. Sin embargo, es difícil que se generen nuevas neuronas en regiones diferentes a la SVZ y el DG debido a que en estas regiones no existen señales intercelulares que transduzcan repuestas neurogénicas. Por lo tanto, a la hora de promover el reemplazo neuronal en el cerebro adulto es preciso estimular la neurogénesis actuando a través de dianas que participen en estas vías de señalización neurogénica. Unas de estas dianas son las kinasas de la familia de las proteínas kinasa de tipo C (PKC). La activación de PKC clásicas mediante diterpenos no tumorogénicos, como el 12-desoxiforbol ER272, promueve la neurogénesis en el cerebro adulto cuando se administra directamente por vía intracerebroventricular. Sin embargo, para que constituya un tratamiento, se hace necesaria la búsqueda de vías de administración no invasivas que eviten la barrera hemato-encefálica (BHE), y que permitan su uso clínico, como lo es la vía intranasal.

HIPÓTESIS. La administración intranasal de ER272 promueve la neurogénesis en cerebros adultos de ratones.

OBJETIVO. Analizar *in vivo* el efecto de la administración intranasal de ER272 sobre la neurogénesis en el cerebro de ratones adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se ha realizado un estudio experimental. Dos grupos de ratones CD1 adultos se trataron con vehículo o ER272 mediante administración intranasal durante 7 días. Posteriormente se estudió si existe un aumento significativo del número de neuroblastos y de neuronas maduras en a SVZ y DG.

RESULTADOS. Observamos que la administración intranasal de ER272 tuvo efectos diferentes dependiendo del área estudiada. En la SVZ se observó en el grupo tratado con ER272 un aumento tanto en el número de células BrdU⁺ como en el de células doble positivas DCX⁺-BrdU⁺, lo que sugería que, además de estimular la proliferación, las células mitóticas estaban diferenciándose hacia fenotipo neuronal. Sin embargo, no hubo cambios en la gliogénesis. Con respecto al DG del hipocampo, tras la administración del compuesto ER272 no se observaron cambios significativos en el número de células BrdU⁺, pero sí aumentó el número de células doble positivas DCX⁺-BrdU⁺; este resultado planteó que el compuesto estudiado no estimula la proliferación en esta región, aunque sí promueve la diferenciación hacia fenotipo neuronal. Con respecto a la gliogénesis, se observó una disminución significativa en el número de células GFAP⁺-BrdU⁺, lo que sugiere que el compuesto no altera la tasa de proliferación neural, siendo su función la promover la diferenciación neuronal, inhibiendo con ello la gliogénesis.

PALABRAS CLAVE: Neurogénesis, intranasal, nicho neurogénico, diterpenos, 12-desoxiforbol, PKC, ER272.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Most prevalent and socially relevant neurological disorders are caused by an irreversible loss of neurons in different areas of the CNS. Most of these diseases are neurodegenerative, that is, they occur as a result of neuronal death. These types of pathologies do not have an effective treatment nowadays, being the search for new therapeutic alternatives one of the main challenges of current neuroscience. The relatively recent discovery of the existence of neuronal replacement from neural stem cells (NSCs) in the adult central nervous system (CNS) has been a starting point in the development of new approaches to replace lost neurons and regenerate brain injuries.

In the adult brain, neurons are generated from neural stem cells; neurogenesis occurs under physiological conditions in two major neurogenic regions: the dentate gyrus of the hippocampus (DG) and the subventricular zone (SVZ). In pathological conditions, neurogenesis is stimulated in these regions and cells with characteristics of neural progenitors migrate towards damaged areas. However, it is difficult to generate new neurons in regions other than the SVZ and the DG because of the absence of intercellular signals that transduce neurogenic responses. Therefore, when promoting neuronal replacement in adult brain, it is necessary to stimulate neurogenesis by acting through targets that participate in these neurogenic signaling pathways. One of these targets are the kinases of the C-type protein kinase (PKC) family. The activation of classical PKC by non-tumor-promoting diterpenes, like the 12-deoxyphorbol ER272, stimulate neurogenesis in the adult brain when administered intracerebroventricularly. However, in order to find a therapeutic purpose, it is necessary to search for non-invasive administration options that avoid the blood-brain barrier (BBB), and that allow its clinical use, such as the intranasal delivery.

HYPOTHESIS. Intranasal delivery of ER272 promotes neurogenesis in adult mice brain.

OBJECTIVE. To analyze *in vivo* the effect of intranasal delivery of ER272 on neurogenesis in the adult mice brain.

MATERIAL AND METHODS. An experimental study was performed. Two groups of adult CD1 mice were intranasally administered PKC activator ER272 or vehicle for 7 days. Later, it was studied if there is a significant increase in the number of neuroblasts and mature neurons in SVZ and DG.

RESULTS. We observed that the intranasal delivery of ER272 had different effects depending on the area studied. In the SVZ, an increase in the number of BrdU⁺ cells and in the double positive DCX⁺-BrdU⁺ cells was observed in the group treated with ER272, which suggested that, in addition to stimulating proliferation, the mitotic cells were differentiating into a neuronal phenotype. However, there were no changes in gliogenesis. In the DG of the hippocampus, after administration of the compound ER272 no significant changes were observed in the number of BrdU⁺ cells, but the number of double positive DCX⁺-BrdU⁺ cells increased; This result suggested that the compound studied does not stimulate proliferation in this region, although it does promote the differentiation towards neuronal phenotype. With regard to gliogenesis, a significant decrease in the number of GFAP⁺-BrdU⁺ cells was observed, which suggests that the compound does not affect to the rate of neural proliferation, and that its function may be to promote neuronal differentiation, thereby inhibiting gliogenesis.

KEYWORDS: Neurogenesis, intranasal, neurogenic niche, diterpene, 12-deoxyphorbol, PKC, ER272.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurológicas de mayor prevalencia y relevancia social están causadas por una pérdida irreversible de neuronas en distintas zonas del SNC. La mayoría de estas enfermedades son de tipo neurodegenerativo, es decir, se producen como consecuencia de la muerte neuronal. Entre ellas, las más frecuentes son la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En otras entidades nosológicas de alta frecuencia, como los accidentes vasculares cerebrales, también se produce una destrucción neuronal. Por último, la pérdida neuronal también ocurre en traumatizados, tanto en el cerebro como en la médula espinal. Sin embargo, ninguna de las alteraciones del SNC que cursan con pérdida de neuronas tiene tratamiento eficaz actualmente, siendo la búsqueda de opciones terapéuticas uno de los campos de investigación más activos en la biomedicina actual. En este sentido, el descubrimiento del papel de las células madre tanto en la generación inicial como en la regeneración de diversos tejidos ha abierto un nuevo enfoque en las perspectivas terapéuticas para estas enfermedades.

1.1 Neurogénesis

La neurogénesis es el proceso de generación de nuevas neuronas a partir de NSCs y progenitores neurales indiferenciados (NPCs). Tiene lugar principalmente durante el desarrollo embrionario, a partir de células madre del tubo neural, pero después del desarrollo se mantienen estas células madre en algunas regiones del cerebro adulto de forma fisiológica, principalmente en la zona subventricular (SVZ), formadas por las paredes laterales del ventrículo lateral, y en la capa subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (DG)¹. Además, también se ha postulado que hay neurogénesis en otras regiones como el neocórtex, estriado o hipotálamo².

1.2 Células madre neurales

Las NSC son células madre multipotenciales capaces de dar lugar a todos los fenotipos neurales, y que en el cerebro adulto son predominantemente quiescentes (presentan una frecuencia de división muy baja). Su división asimétrica produce precursores neurales indiferenciados (NPC), con idéntica potencialidad que las NSC pero que

presentan un mayor ritmo de división que éstas. Estos NPC se diferenciarán hacia precursores unipotenciales, bien hacia neuroblastos (que generarán neuronas maduras), bien hacia glioblastos (que generarán oligodendrocitos o astrocitos)³⁻⁵. Será el cambio de la división simétrica (replicativa) a asimétrica (proliferativa y madurativa) de las NSC lo que determine la producción secuencial de todas las neuronas corticales que conforman las seis capas de la corteza⁶.

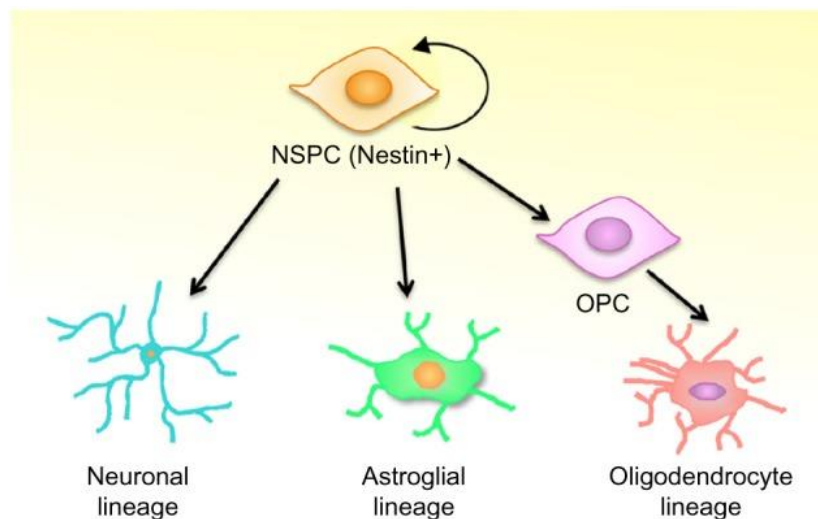


Ilustración 1. Diferenciación de las NPC: La NSC se divide asimétricamente, quedando un precursor neural (NPC), y la NSC. Este NPC tiene la capacidad, tanto de autorenovarse, como de diferenciarse hacia cualquiera de las tres líneas celulares del SNC (neuronal, glial y oligodendrónica). La línea oligodendrónica va precedida de la generación de precursores oligodendrónicos (OPC), que se diferencian posteriormente a oligodendrocitos. Tomada y modificada de (Kulkarni A, Ganesan P, O'Donnell LA. Interferon gamma: Influence on neural stem cell function in neurodegenerative and neuroinflammatory disease. Vol. 2016, Clinical Medicine Insights: Pathology. 2016. p. 9–19)⁷.

1.3 Nichos neurogénicos

Son microambientes en los que residen los precursores neurales, y que están compuestos por factores solubles, así como moléculas de adhesión y matriz extracelular que favorecen la proliferación y diferenciación a neuronas de las NSC y NPC⁸. Fuera de estos nichos neurogénicos, las células madre neurales tienden a diferenciarse a células gliales.

Los principales son SVZ y SGZ. Cada nicho tiene una embriogénesis distinta. Así, mientras la SVZ queda como una continuación de la zona ventricular embrionaria (VZ) embrionaria del telencéfalo, la formación del DG implica la generación de una fuente

de células progenitoras alejadas de la VZ, y en proximidad con la superficie pial. Esta región proliferativa adicional será la que se convierta en la SGZ durante los primeros estadios postnatales⁹. Además de SVZ y SGZ, se postula la existencia de otras regiones con capacidad neurogénica. Estas áreas son denominadas como “regiones no canónicas de neurogénesis”^{1,2}.

Las más aceptadas son el hipotálamo y área circundante al tercer ventrículo. Diversos estudios han demostrado la existencia de neurogénesis en estas áreas^{10–13}. No obstante, el número de neuronas producidas en estas regiones es mucho menor que en SVZ y SGZ. Además, en el hipotálamo predomina la diferenciación de las NPC hacia glia, lo que disminuye la tasa de neurogénesis en condiciones normales².

Otros estudios hablan sobre la neurogénesis parenquimal^{11,14,15}. No obstante, ésta no se limita a un área ni tasa concretas, aunque algunos apuntan hacia neocórtex y estriado¹⁴, sino que abarca una serie de diferentes procesos neurogénicos que se manifiestan de forma distinta según la especie animal, edad y estatus fisiológico o patológico. A efectos prácticos, la neurogénesis parenquimal constitutiva se considera un fenómeno fisiológico raro en mamíferos¹⁵.

1.4 Reposición neuronal fisiológica en el cerebro adulto

Las células madre epiteliales en el tubo neural embriológico son las responsables de generar nuevas neuronas mediante su proliferación y diferenciación durante las primeras fases del desarrollo del SNC. Una vez se cierra el tubo neural, las NSC quedan restringidas en los nichos neurogénicos^{1,8}. Como se ha dicho anteriormente, en el cerebro adulto los principales nichos neurogénicos que encontramos son la SVZ y la SGZ del DG⁸. En ratones, las nuevas neuronas generadas en la SVZ migran hacia el bulbo olfatorio (OB), donde maduran y se convierten en interneuronas locales^{4,10,16–18}. Por otra parte, las neuronas nacidas en la SGZ migran hacia el DG, donde se integran en circuitos preexistentes⁸.

El DG se origina a partir del neuroepitelio dentado (DNE), también conocido como *matriz primaria* (una región del VZ). En las últimas etapas de la gestación, las células

progenitoras migran desde el DNE hacia la región pial de la corteza medial. Estos progenitores (NSC y NPC en diferentes estadios de diferenciación) migran desde la VZ hacia la fisura del hipocampo, conformando una nueva población de células progenitoras denominada *matriz secundaria*. Seguidamente, los NPC alcanzan la fisura del hipocampo, donde se acumulan y forman otro núcleo de células proliferantes, denominado *matriz terciaria*. Finalmente, en las etapas más tempranas del periodo postnatal, será la matriz terciaria la única fuente de células progenitoras en el DG⁹.

Por otra parte, la SVZ surge como una continuación de la VZ⁹. En la SVZ encontramos varias poblaciones celulares: tipo A (neuroblastos), tipo B (células con características astrocíticas), tipo C (precursores con alta capacidad proliferativa) y tipo E (células endodiales que separan, a modo de capa, el ventrículo de la SVZ)⁴.

El crecimiento y mantenimiento de las NSC en el cerebro adulto son dependientes de factores externos y señales intracelulares que pueden tanto promoverlos como inhibirlos^{6,9}. En lo referente a los factores externos, estudios recientes han demostrado que los nutrientes juegan un papel muy importante en este proceso. Modulan, principalmente, funciones básicas como son la proliferación, secreción y autofagia. Por otra parte, la función bioenergética intracelular, no solo de los nutrientes sino también de los metabolitos que se generan, influye en el ciclo celular, ya que les permite actuar como moléculas de señalización, afectando a las diversas rutas intracelulares, así como a la expresión de genes (gracias a modificaciones que pueden ejercer sobre la cromatina); de hecho, la mayoría de enzimas modificadoras de cromatina requieren de substratos o cofactores que son intermediarios del metabolismo celular¹⁹. Es por ello que una alteración en el aporte metabólico celular determina un remodelado epigenómico, así como la consecuente transcripción adaptativa⁶.

En el DG, diversas situaciones (tanto fisiológicas como patológicas: ejercicio físico, aprendizaje de habilidades...) pueden estimular la neurogénesis específicamente en esta región en el cerebro adulto. Por otra parte, hay diversas vías de señalización molecular, entre las que se encuentran las BMPs, Notch, GABA, Wnt e IGFs que han

demostrado ser vías de regulación de la tasa de neurogénesis en el DG del cerebro adulto⁹.

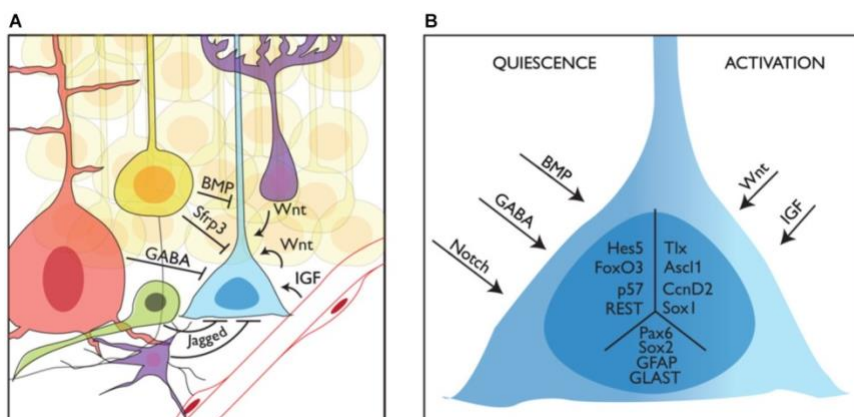


Ilustración 2. Regulación de la neurogénesis en DG del cerebro adulto del ratón: (A) Representación de una célula madre neural en la SGZ del DG, y sus interacciones con el nicho. Las células de la granulosa (amarillo), interneuronas (rojo), precursores intermedios (verde) envían señales que promueven la quiescencia de la célula, mientras que los vasos sanguíneos y astrocitos (morado) envían señales de activación. (B) Las diversas señales externas que interactúan con la célula madre neural desencadenan la activación de factores internos que provocan bien la quiescencia celular (izquierda), bien su activación y proliferación (derecha). Respecto a los factores representados en el centro de la célula, no se conoce muy bien su papel en el cambio del estado de quiescencia al de activación. Tomada y modificada de (Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci.* 2014;8(November):1–19.)⁹.

En la SVZ, factores como el EGF, FGF o el TGF α promueven el crecimiento de las NSC. Las NSC periventriculares expresan EGFR de forma característica (también FGFR, pero en menor medida), y se ha visto que su expresión aumenta de forma compensatoria ante la depleción de NPCs en el medio^{4,5}.

1.5 PKC

Los factores de crecimiento como el EGF o el bFGF activan a receptores tirosin-kinasas (RTK) formados por un dominio extracelular de unión a ligando, una región transmembrana y una región citoplasmática que contiene el dominio tirosina-kinasa. Cuando el factor se une a su receptor, éste se fosforila y dimeriza activando cascadas de señalización intracelular^{3,5,20}.

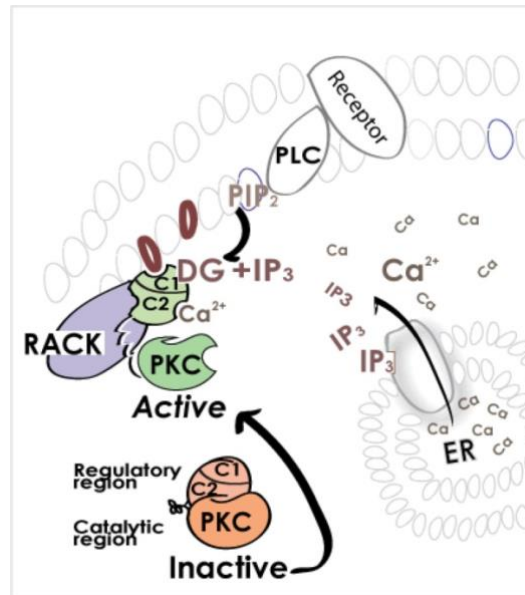


Ilustración 3. Activación de las PKCs: Cuando un ligando se une a su correspondiente receptor, se activa la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza el fosfatidil-inositol-bisfosfato (PIP₂) a diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP₃), provocando la salida de calcio del retículo endoplásmico (ER), con la consiguiente elevación de la concentración del mismo en el citoplasma. El aumento de la concentración de DAG y calcio provocará la translocación de la PKC hacia la membrana plasmática, donde se unirá a una proteína RACK y se activará, regulando el ciclo celular. Tomada y modificada de (Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KK V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(12):937–57)²¹.

La familia de las PKC está constituida por diez serin-treonin kinasas que se subdividen en tres subfamilias: clásicas (α , β I, β II y γ), noveles (δ , ϵ , η y θ) y atípicas (λ / ι y ζ). De éstas, las atípicas son las que están involucradas en la diferenciación de las NSC hacia neuronas²². Otras isoformas de la PKC también se expresan en NPC aisladas del SVZ de ratones recién nacidos, de las cuales la PKC ϵ parece ser relevante para la diferenciación hacia astrocitos. También es posible que algunas isoformas estén implicadas en otros aspectos de la neurogénesis adulta, tales como la proliferación de las NPC, autoregeneración, supervivencia o diferenciación neural²³.

1.6 Regulación de la actividad de PKC

Las PKC son una familia de diez serin-treonin kinasas altamente relacionadas entre sí, que dependen de la unión a fosfatidilserina para su actividad, y que atendiendo a su estructura y requerimiento de otros cofactores pueden dividirse en tres subfamilias²⁴: I) PKCs clásicas o convencionales (cPKCs), que son PKC α , β (β I y β II) y γ , que se activan en presencia de diacilglicerol (DAG) y calcio; II) PKCs noveles (nPKCs) δ , ϵ , η y θ , que sólo requieren DAG para activarse; y III) PKC atípicas (aPKCs) λ / ι y ζ , independientes de

calcio y DAG, y cuya actividad se regula por interacciones proteína-proteína. La unión de DAG recluta a las cPKCs y nPKCs en la membrana plasmática, donde un cambio conformacional determina su activación definitiva.

1.7 Activación de PKC por diterpenos

Los diterpenos son esteres naturales derivados de especies de plantas, y que se conoce que activan la vía de las PKC clásicas y novedales gracias al mimetismo molecular que presentan con el diacilglicerol (DAG), activador fisiológico de las PKC. El más conocido es el PMA²⁵, que presenta una gran actividad tumorigénica, lo que hace que sea inadecuado para su tratamiento clínico²⁶.

También existen diterpenos no tumorigénicos, como la prostratina (un 12-desoxiforbol) y diterpenos derivados de la familia *Euphorbiaceae*, que son capaces, al igual que el PMA, de promover la neurogénesis mediante activación de PKC. Los resultados de nuestro equipo de investigación mostraron que tanto la administración intracerebroventricular de prostratina como, de ER272, eran capaces de promover la proliferación de NPCs tanto *in vitro* como *in vivo* tras su administración intracerebroventricular (icv) sin tener un efecto potencialmente tumorigénico³.

Al hilo de todo lo expuesto anteriormente, parece lógico hipotetizar que los diterpenos podrían constituir un tratamiento que active la neurogénesis en patologías que cursan con pérdida de neuronas. Sin embargo, para que este tipo de compuestos pueda utilizarse en la clínica, es preciso encontrar nuevas vías de administración no invasivas de estos compuestos. En este proyecto se pretende buscar métodos no invasivos y efectivos de administración de ER272 con el desafío de que deben atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).

1.8 Vía de administración intracerebroventricular

Es un proceso invasivo cuya finalidad es administrar una sustancia directamente en el sistema ventricular encefálico, evitando de este modo la BHE. El procedimiento precisa de una anestesia previa, trepanación y, finalmente, inyección de la sustancia en el ventrículo³.

1.9 Líquido cefalorraquídeo y Barrera sangre-LCR

Desde las primeras etapas del desarrollo, las NSC se encuentran en íntimo contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR) al encontrarse en la superficie de los ventrículos. Una vez se cierra el tubo neural, formándose con él el sistema ventricular primitivo, queda en su interior un remanente de líquido amniótico que conformará el LCR primitivo. Más tarde este fluido se irá regenerando gracias a mecanismos de secreción activa procedentes de los plexos coroideos^{27,28}.

Los plexos coroideos (PC) son una estructura que se localiza en los ventrículos cerebrales. Están compuestos por un tejido epitelial muy vascularizado y cubiertos por microvellosidades, formando la barrera sangre-LCR (BSLCR)²⁹, que cumple varias funciones:

- Producen el **LCR**²⁷.
- Permiten el **transporte de moléculas** gracias a la expresión de transportadores tanto en membrana apical como basal, impidiendo así la acumulación de sustancias nocivas para el cerebro²⁷.
- Intervienen en procesos de **reparación** cerebral gracias a la secreción de sustancias neuroprotectoras²⁷.
- **Síntesis de proteínas**, incluyendo prostaglandinas y factores de crecimiento.
- Reabsorción de sustancias desde el LCR²⁷.
- Posible implicación en la **vigilancia inmune** del cerebro, aunque no se conocen muy bien los mecanismos implicados²⁷.

Gracias a la síntesis de proteínas y al transporte transmembrana de diversas sustancias, los PC favorecen un ambiente neurogénico, por lo que también juegan un papel importante en el reemplazo celular dentro del SNC^{27,29,30}. Además, hay una gran variedad de factores que se conoce que promueven la neurogénesis y que están presentes en el LCR, como son: FGF, IGF, Sonic hedgehog (Shh) y ácido retinoico; así como también resulta interesante la presencia de reguladores del metabolismo de los lípidos, glucosa y folato (y algunos de sus derivados)³¹.

Por otra parte, se ha visto que el LCR tiene un efecto edad-dependiente sobre la capacidad proliferativa de las NSC, sugiriendo que su composición podría ser relevante para la formación y desarrollo de la corteza cerebral³⁰, y gracias a los avances en proteómica, se han podido establecer similitudes entre humanos y roedores en puntos determinados del desarrollo de la corteza cerebral³².

Junto con la BHE, son las dos barreras biológicas principales que aíslan y protegen al SNC; no obstante, la BSLCR es menos compleja que la BHE al estar compuesta únicamente por las células epiteliales de los PC, frente a las múltiples capas e interconexiones que presenta la BHE^{27,33}. La integridad de esta barrera se mantiene, por tanto, gracias a la regulación del flujo sanguíneo de los vasos que conforman los PC²⁷.

A grandes rasgos, mientras que la BSLCR separa el sistema vascular del LCR, la BHE mantiene la homeostasis tanto en el parénquima cerebral como en el sistema vascular, permitiendo el correcto funcionamiento de las células que los conforman. Aunque ambas barreras tienen funciones similares, difieren respecto a sus propiedades morfológicas y funcionales²⁷.

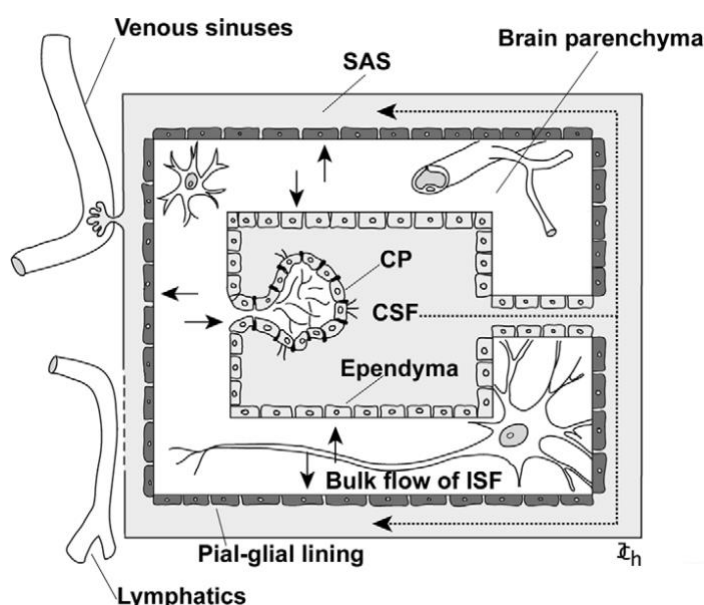


Ilustración 4. BSLCR: Diagrama esquemático que representa los componentes de la BSLCR. Los PC están formados por una hilera simple de células cúbicas unidas entre sí por uniones estrechas ("tight junctions") que, junto con la aracnoides van a constituir la BSLCR. Estas células se continúan con el revestimiento ependimario, aunque tienen funciones distintas. La mayor parte del LCR se produce en los PC, aunque hay una parte (10-30%) que procede del líquido intersticial (ISF), generándose en condiciones normales un flujo continuo de líquido desde el intersticio hacia

el LCR. El LCR ventricular está separado del parénquima cerebral por el endotelio, mientras que el LCR fuera de los ventrículos está separado del parénquima por el revestimiento pial. Ambos revestimientos son un obstáculo para el flujo de líquido y difusión de sustancias del LCR al parénquima. El LCR nace en los ventrículos laterales, y desde ahí es transportado hacia el tercer ventrículo, acueducto cerebral y cuarto ventrículo, hasta acabar en el espacio subaracnoideo (SAS). Una vez ahí el LCR se reabsorbe hacia la sangre a través de las vellosidades aracnoideas que protruyen en los senos venosos. Parte del LCR también se reabsorbe a lo largo de los nervios craneales y raíces espinales hacia los vasos linfáticos. Abreviaciones: CP (plexos coroideos); CSF (líquido cefalorraquídeo). Tomada y modificada de (Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. The Choroid Plexus-Cerebrospinal Fluid System: From Development to Aging. Current Topics in Developmental Biology. 2005)²⁹.

1.10 Barrera hemato-encefálica

Las neuronas del SNC se comunican gracias a una combinación de señales tanto eléctricas como químicas, lo que necesita de una homeostasis rigurosa en las regiones axónicas y de sinapsis para el correcto funcionamiento del parénquima cerebral. Esto se consigue, en gran medida, gracias a la existencia de la BHE³⁴.

La BHE separa el plasma sanguíneo del líquido intersticial, siendo una de las barreras biológicas más selectivas e impermeables en mamíferos. La conforman varios tipos de células, de las cuales la que ejerce como barrera principal es la célula endotelial. No obstante, estas células endoteliales se comunican con otras adyacentes a ellas (pericitos, astrocitos, microglía, neuronas y otros componentes del parénquima cerebral), lo que conforma la denominada Unidad Neurovascular (NVU)³³:

- **Célula endotelial:** Para sostener la BHE, estas células endoteliales difieren del resto de células endoteliales presentes en los demás tejidos. Presentan proteínas transportadoras y receptores específicos que permiten el control de la entrada y salida de metabolitos a través de ellas. Además, presentan uniones intercelulares estrechas con elevada resistencia eléctrica, y ausencia de fenestraciones, lo que permite únicamente el transporte por difusión pasiva de iones y solutos de muy pequeño tamaño³³.
- **Astrocitos:** Emiten unas prolongaciones en su porción distal que rodean las células endoteliales, lo que permite interactuar con ellas para controlar los niveles de metabolitos entre el plasma y el líquido extracelular gracias a la presencia de acuaporinas que permiten la regulación de la cantidad de agua que hay en el parénquima. Además, mantienen y protegen a las neuronas gracias al control que ejercen sobre las concentraciones de iones y neurotransmisores para mantener el balance homeostático³³.

- **Pericitos:** Son células perivasculares esenciales en la integridad de la BHE, de origen mesodérmico, que emiten unas prolongaciones que envuelven las paredes de las células endoteliales. Su principal función es la regulación del calibre vascular y flujo sanguíneo cerebral³³.
- **Microglía:** Deriva de precursores hematopoyéticos originados en el saco vitelino, y que migraron al SNC. Actúan como la principal línea de defensa después de la BHE, y juegan un papel muy importante en la respuesta inmune innata del SNC. No se conoce muy bien cómo interactúan con las células endoteliales en el control de la homeostasis³³.
- **Neuronas:** Emiten prolongaciones axónicas que conectan con el músculo liso vascular contienen moléculas vasoactivas que controlan el calibre vascular y flujo sanguíneo cerebral³⁴.
- **Membrana basal:** Formada por un conjunto de proteínas estructurales sintetizadas por astrocitos, pericitos y células endoteliales, que posteriormente secretan hacia la matriz extracelular. Ayuda a regular la comunicación entre los componentes de la NVU, y también interviene en la diferenciación de los pericitos³³.

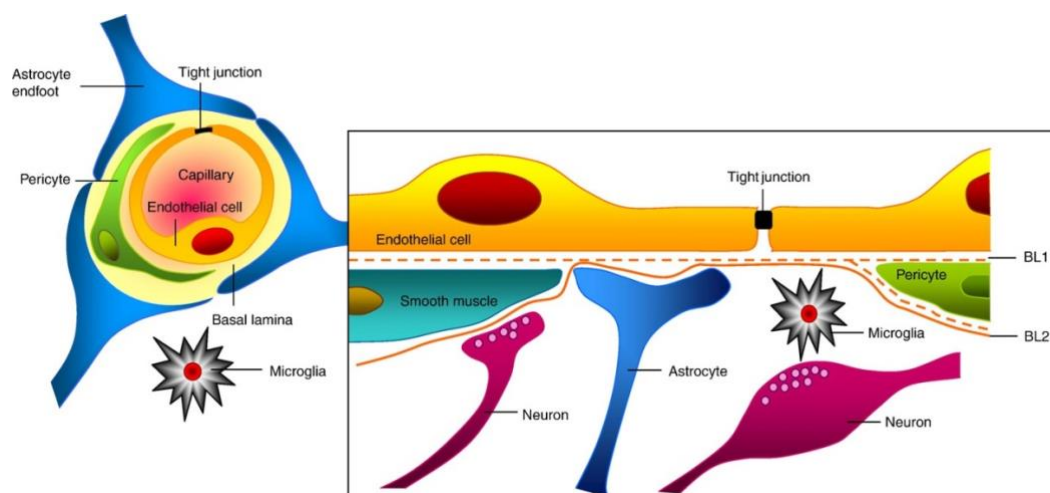


Ilustración 5. Asociaciones celulares en la NVU: Representación esquemática de la estructura de la BHE (célula endotelial, pericito y prolongación astrocítica), así como de las interacciones entre las distintas células que componen la NVU. Tanto las células endoteliales como los pericitos contribuyen a la formación de una lámina basal perivascular (BL1) que difiere, en composición, de la matriz extracelular de las prolongaciones astrocíticas (BL2). Los procesos astrocíticos forman una red compleja que rodea por completo los capilares. Esta asociación tan cerrada es importante para la inducción y mantenimiento de las propiedades de la BHE. Tomada y modificada de (Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):13–25)³⁴.

La BHE cumple varias funciones:

- **Mantiene una concentración de iones óptima** para el funcionamiento de las señales sinápticas³⁴.
- **Evita el paso de grandes cantidades de glutamato** desde el torrente sanguíneo y, con ello, la neurotoxicidad asociada a éste³⁴.
- **Impide el paso de macromoléculas hacia el SNC.** El contenido de proteínas en el SNC es mucho menor que en plasma, con lo que el paso de grandes cantidades de albúmina, protrombina y plasminógeno podrían dañar el parénquima provocando apoptosis celular³⁴.
- **Protege al SNC del paso de toxinas** circulantes en sangre. Éstas pueden ser metabolitos endógenos, proteínas o xenobióticos ingeridos en la dieta³⁴.
- **Nutrición cerebral.** La BHE es muy poco permeable a nutrientes y metabolitos necesarios para el correcto funcionamiento del SNC. No obstante, la presencia de transportadores específicos expresados en las células endoteliales permite el suministro de estas sustancias³⁴.

1.11 Vía de administración intranasal

Consiste en la administración de una molécula a través de la porción superior de la cavidad nasal³⁵. Las principales vías por las que el fármaco es capaz de acceder al SNC implican a los nervios olfatorio y trigémino³⁶.

Al nervio olfatorio se accede directamente a través de la lámina cribosa del etmoides, y desde ahí entra directamente en el cerebro. El nervio trigémino, por otra parte, es capaz de acceder al cerebro tanto por vía anterior (a través de la lámina cribosa) como posterior (a través del puente troncoencefálico)^{35,36}.

El transporte de sustancias a través de ambos nervios se realiza por mecanismos tanto intracelulares como extracelulares. Los mecanismos intracelulares consisten en la absorción del fármaco por las neuronas sensitivas del nervio olfatorio (OSNs), tanto por difusión como por endocitosis. Las OSNs tienen la capacidad de endocitar una gran variedad de sustancias, entre las que se incluyen moléculas de gran tamaño y virus. No obstante, este mecanismo es lento, y requiere desde varias horas hasta días para

alcanzar un objetivo terapéutico significativo. Por otra parte, el mecanismo extracelular es mucho más rápido. Ésta variabilidad en la velocidad de transporte sugiere la presencia de compuestos extracelulares presentes a lo largo del trayecto de los nervios olfatorio y trigémino que permiten el transporte del fármaco hacia el SNC³⁶.

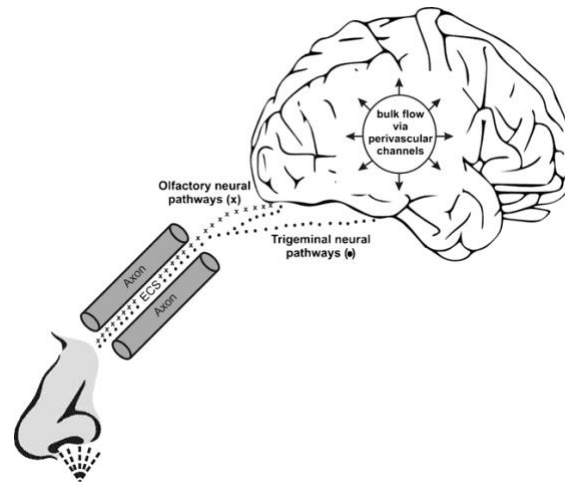


Ilustración 6. Esquema de la vía de administración intranasal. Abreviaciones: ECS (espacio extracelular). Tomado y modificado de (Chapman CD, Frey WH, Craft S, Danielyan L, Hallschmid M, Schiöth HB, et al. *Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. Pharm Res.* 2013;30(10):2475–84)³⁶.

2. JUSTIFICACIÓN

Tradicionalmente, el tratamiento de los trastornos neurológicos ha consistido en la administración de un fármaco por vía oral o sistémica. No obstante, hay una gran cantidad de inconvenientes a la hora de utilizar dicha vía si se pretende tratar una enfermedad del SNC. La más importante es que, para muchas moléculas, resulta imposible su paso a través de la BHE; por otra parte, las que lo consiguen, tienen una biodisponibilidad muy reducida, por lo que su efecto a nivel del SNC será reducido, además de las reacciones adversas que puede conllevar la interacción de dicha molécula con otros órganos.

Como alternativa, la inyección intracerebroventricular permite la entrada directa del fármaco al cerebro. No obstante, es una técnica invasiva que conlleva muchos riesgos, y no es aplicable desde un punto de vista clínico.

Por ello, se hace necesaria la búsqueda de otras vías de administración que no impliquen un procedimiento invasivo, y que aumenten la biodisponibilidad del fármaco en el SNC. La vía de administración intranasal ha demostrado alcanzar estos propósitos en una gran variedad de compuestos, como la insulina. Es una técnica no invasiva y sin riesgo de complicaciones; además, por esta vía se alcanzan rápidamente elevados niveles de estos compuestos en el SNC, evitando con ello efectos secundarios en otros órganos (como ocurría con la administración sistémica)³⁶.

Un tratamiento alternativo es la administración intranasal, un método muy utilizado en la actualidad para suministrar fármacos al sistema nervioso. Ha sido descrito que la administración intranasal de sustancias biológicas permite atravesar la barrera hematoencefálica y la distribución de estas sustancias hasta diferentes regiones del cerebro, incluidas DG y SVZ. Es el caso, por ejemplo, del IGF o de la insulina^{37,38}.

3. HIPÓTESIS

La administración intranasal de ER272 promueve la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo y zona subventricular en el cerebro de ratones adultos.

4. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

4.1 Objetivo generales

Estudiar el efecto de la administración intranasal del activador de PKC ER272 durante 7 días sobre la neurogénesis en la SVZ y DG del cerebro de ratones adultos.

4.2 Objetivos específicos

1. Analizar la proliferación celular en la SVZ y DG

- Cuantificar el número de células que expresa BrdU en DG y SVZ.

2. Analizar las células glía de nueva formación en la SVZ y DG

- Cuantificar el número de células GFAP⁺ y GFAP⁺-BrdU⁺ en DG y SVZ.

3. Analizar los neuroblastos de nueva formación en la SVZ y DG

- Cuantificar el número de células Doblecortina (DCX)⁺ y DCX⁺-BrdU⁺ en DG y SVZ.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio

Consistió en un estudio experimental *in vivo*, en el que se analizó la neurogénesis y la gliogénesis en animales tratados con ER272 en comparación con un grupo control tratado con vehículo.

5.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones de la cepa CD1 adultos. Su cuidado y manipulación se realizó de acuerdo con la reglamentación actual recogida en el artículo 20.2 del Decreto 65/2012 del 13 de marzo y el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, para el uso y protección de animales de laboratorio. Los animales se colocaron en jaulas con pienso y agua *ad libitum* con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. La temperatura se mantuvo a $21 \pm 1^\circ \text{C}$.

5.3 Tamaño muestral

Administración intranasal de ER272 / vehículo a 20 ratones adultos durante 7 días:

- **10 ratones tratados intranasalmente con vehículo.**
- **10 ratones tratados intranasalmente con ER272.**

Los animales fueron tratados diariamente con ER272 (1 μ M) o vehículo por vía intranasal durante 7 días. Además, recibieron una inyección intraperitoneal de bromodesoxiuridina (BrdU), análogo de la timidina que se une a los núcleos de células proliferantes, en días alternos, coincidiendo la última inyección con el último día de tratamiento.

5.4 Procesamiento cerebral

Una vez finalizado el tratamiento, los ratones utilizados para estudios de inmunohistoquímica se anestesiaron profundamente con Dolethal (120 mg / Kg i.p.; Vétoquinol); y fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% (PFA) en tampón fosfato 0,1 M. Los cerebros se retiraron y fijaron en PFA al 4% durante dos horas adicionales, y se crioprotegieron en sacarosa al 30% durante la noche a 4º C. Seguidamente, se realizaron secciones de 30 micras de espesor en un criostato almacenándolos posteriormente en una solución crioprotectora (glicerol : PBS. 1 : 1 v / v) a -20º C hasta su procesamiento.

5.5 Inmunohistoquímica

Las secciones que presentaban nichos neurogénicos se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) tres veces, durante 5 minutos cada uno; sólo para eliminar los restos de glicerol. Luego, se incubaron durante 2 horas a 65º C, utilizando citrato (SSC 2x) y formamida (1:1, S / S). Seguidamente, las secciones se lavaron de nuevo; tres veces, durante 5 minutos cada uno, con SSC 2X. Las secciones se incubaron con HCl 2N, durante 30 minutos, a 37º C.

A continuación, para neutralizar la solución de ácido, se lavaron en borato a lo largo de tres lavados de 15 minutos cada uno. Posteriormente, se lavaron de nuevo con PBS, tres veces, durante 5 minutos cada uno. A continuación, los cortes se incubaron utilizando una solución de bloqueo que contiene 2,5% (w / v) de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,1% (v / v) de Triton X-100 en PBS durante 1 hora, para bloquear la unión no específica de anticuerpos. Las incubaciones con anticuerpos primarios se llevaron a cabo durante la noche a 4º C en solución de bloqueo. Para llevar a cabo la técnica de inmunohistoquímica, se emplearon los siguientes anticuerpos primarios:

Anticuerpo Primario	Origen	Características del Antígeno	Dilución	Casa comercial
Anti-BrdU (Bromodesoxiuridina)	Ratón Monoclonal	BrdU, identifica núcleos proliferantes	1:100	Dako (Glostrup, Denmark)
Anti-GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial)	Conejo Policlonal	GFAP, marcador de astrocitos	1:3000	Dako (Glostrup, Denmark)
Anti-DCX (Neural Migration Protein Doublecortin)	Cabra Policlonal	DCX, marcador de precursores neurales	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados durante el proceso de inmunohistoquímica

Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Posteriormente se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente y en oscuridad. Después se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS. Las secciones se montaron en portaobjetos con *fluoroGel*[®] (*Electron Microscopy Science*), una solución acuosa que está especialmente diseñada para conservar la fluorescencia. Los anticuerpos secundarios utilizados se resumen en la siguiente tabla:

Anticuerpo secundario	Origen	Fluoróforo	Dilución	Casa comercial
Anti-IgG de ratón	Burro	Alexa Fluor 488, verde	1:1000	Invitrogen
Anti-IgG de conejo	Burro	AlexaFluor 594, rojo	1:1000	Invitrogen
Anti-IgG de cabra	Burro	Alexa Fluor 594, rojo	1:1000	Invitrogen

Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados durante el proceso de inmunohistoquímica

5.6 Criterios de inclusión y exclusión

- **Criterios de inclusión:** Ratones machos de la cepa CD1 de 2-3 meses de vida, sin patología del SNC.
- **Criterios de exclusión:** Cualquier ratón hembra o ratón macho que no cumpla alguno de los criterios anteriormente descritos, o que haya sufrido alguna lesión o daño durante el tratamiento.

5.7 Variables que se estudiarán

Variables independientes:

- Tratamiento con ER272.
- Tratamiento con vehículo.

Variables dependientes: Para cada variable independiente se evaluó cada una de las variables dependientes:

- Expresión de BrdU.
- Expresión de GFAP.
- Expresión de Doblecortina.
- Porcentajes de células proliferantes que son neuroblastos
- Porcentaje de células proliferantes que son glioblastos

Estas variables se estudiaron tanto en la SVZ como en el DG.

5.8 Recogida de datos

Se tomaron cortes de la zona subventricular (SVZ) y del giro dentado del hipocampo (DG) del cerebro de los ratones. Una vez realizada la inmunohistoquímica, se procedió a tomar fotos de dichas regiones. Para ello se empleó un microscopio de epifluorescencia (*BX60, Olympus, Center Valley, PA, EE.UU.*). Se utilizó el programa de análisis de imagen *ImageJ* para la cuantificación.

5.9 Análisis de datos

Los datos fueron ordenados en una base de datos Excel y analizados mediante el programa estadístico *IBM SPSS Statistics 15.0*. Con los resultados obtenidos se cuantificaron las variables en los diferentes grupos y condiciones experimentales, y se llevó a cabo un análisis de varianza donde se contrastaron los factores de presencia/ausencia de neurogénesis/gliogénesis en SVZ y DG, y presencia/ausencia de tratamiento. Se realizó un test de Kolmogórov-Smirnov para el análisis de la normalidad, un test de Cochran para la homogeneidad de la varianza y un análisis de la varianza (ANOVA en caso de más de dos variables, y t-student para el análisis de dos variables); En caso de no poder hacerse test paramétricos, se utilizaron métodos estadísticos no paramétricos para testar diferencias entre dos grupos de tratamiento.

Se consideraron valores estadísticamente significativos $p < 0.05$. Los resultados fueron analizados a doble ciego.

5.10 Limitaciones del estudio

La principal dificultad del estudio fue la escasez y dificultad en la obtención de ER272. Una solución para ello sería encontrar una mayor fuente de este compuesto en el menor tiempo posible, así como poder producirla, por métodos de ingeniería química, a raíz de otro compuesto que comparta una estructura similar.

Otra limitación fue el escaso número de animales que se pudieron utilizar. Este número está calculado según trabajos anteriores en los que se han realizado análisis similares y está aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal. La escasa variabilidad entre este tipo de muestras permite obtener normalidad con un número pequeño de animales. No obstante, sabemos que es una de las limitaciones de este tipo de estudios y trabajamos con el objetivo de cumplir con las denominadas “3 R” de la experimentación animal³⁹:

- Reducir el número de animales.
- Reemplazar métodos que supongan el uso de animales por otros sin animales siempre que el resultado sea igual.
- Refinar los métodos para aliviar y evitar el sufrimiento de los animales de experimentación.

6. ASPECTOS ÉTICOS

Este trabajo de investigación implicó el uso de animales de experimentación. Los protocolos establecidos para el uso de animales de experimentación están recogidos en el Artículo 20.2 del Decreto 65/2012 de 13 de marzo por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales y Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Para la realización de este trabajo, se diseñó una estrategia experimental acorde con la regulación recogida en el Real Decreto 53/2013 y se tomaron unas medidas básicas.

Los animales que se utilizaron son ratones CD1 criados para fines experimentales en el Servicio Central de Experimentación y Producción Animal (SEPA) de la Universidad de Cádiz por criadores acreditados.

Considerando la necesidad de la experimentación e investigación animal para el progreso científico, asumimos que no es motivo suficiente para justificar cualquier tipo de experimento. En este sentido, el número de animales empleados en cada grupo se ajustó para que la “n” final fuese la más pequeña posible. Asimismo, todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo un estricto seguimiento de “no dolor” que continuó en el postoperatorio. Únicamente no se actuó sobre el estrés causado por su individualización en la estabulación tras el acto quirúrgico. Sí se realizaron maniobras diarias de “handling” con el fin de reducir o anular el estrés por manipulación y administración de los tratamientos. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en las instalaciones del SEPA.

La actuación sobre los animales la realizaron investigadores capacitados y acreditados conforme a la normativa vigente.

Al ser un proyecto encuadrado en el tipo II de los establecidos en el Real Decreto 53/2013, se obtuvo previamente la aprobación al Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEAA) de la UCA y de la Junta de Andalucía.

7. RESULTADOS

7.1 La administración intranasal de ER272 induce la proliferación en la SVZ

Con el motivo de estudiar el efecto de la administración intranasal de ER272 (1 μ M) sobre la neurogénesis en la SVZ de cerebros de ratones adultos sanos, comenzamos midiendo el número de células proliferantes. Para ello, se utilizó el marcador BrdU, un análogo de la timidina que se une a núcleos en proliferación. Los ratones fueron tratados con ER272/vehículo durante 7 días, junto con una inyección intraperitoneal de BrdU que se realizaba en días alternos (coincidiendo el día 7 con la última inyección).

Como puede observarse más adelante (Ilustración 7 A-B), en los ratones tratados con ER272 se observó un mayor número de células BrdU⁺ que en aquellos tratados con vehículo (grupo control), indicando que en los animales tratados con ER272 existía una mayor proliferación. Este resultado únicamente nos sugiere que existió proliferación celular, pero no nos revela de qué fenotipo celular. Para ello se combinó la detección de BrdU con otros marcadores más específicos (GFAP para glioblastos y DCX para neuroblastos).

7.2 La administración intranasal de ER272 estimula la formación de neuroblastos en la SVZ

Para poder valorar la neurogénesis, se utilizó el marcador DCX, una proteína asociada a los microtúbulos que expresan tanto neuroblastos como neuronas inmaduras. Se clasificaron como neuroblastos aquellas células que co-expresaron BrdU y DCX. Se cuantificaron el total de células DCX⁺-BrdU⁺, y se analizó qué proporción de células de ese tipo había en la SVZ. Se compararon dichos resultados entre ambos grupos de estudio.

Tal y como se puede observar en la Ilustración 7, en los ratones que fueron tratados con ER272 (1 μ M) intranasal durante 7 días se pudo apreciar un mayor número de neuroblastos formados en la SVZ de ratones adultos sanos, en comparación con los que recibieron únicamente vehículo por vía intranasal. Este resultado sugiere que la administración intranasal de ER272 promueve la neurogénesis en esta región.

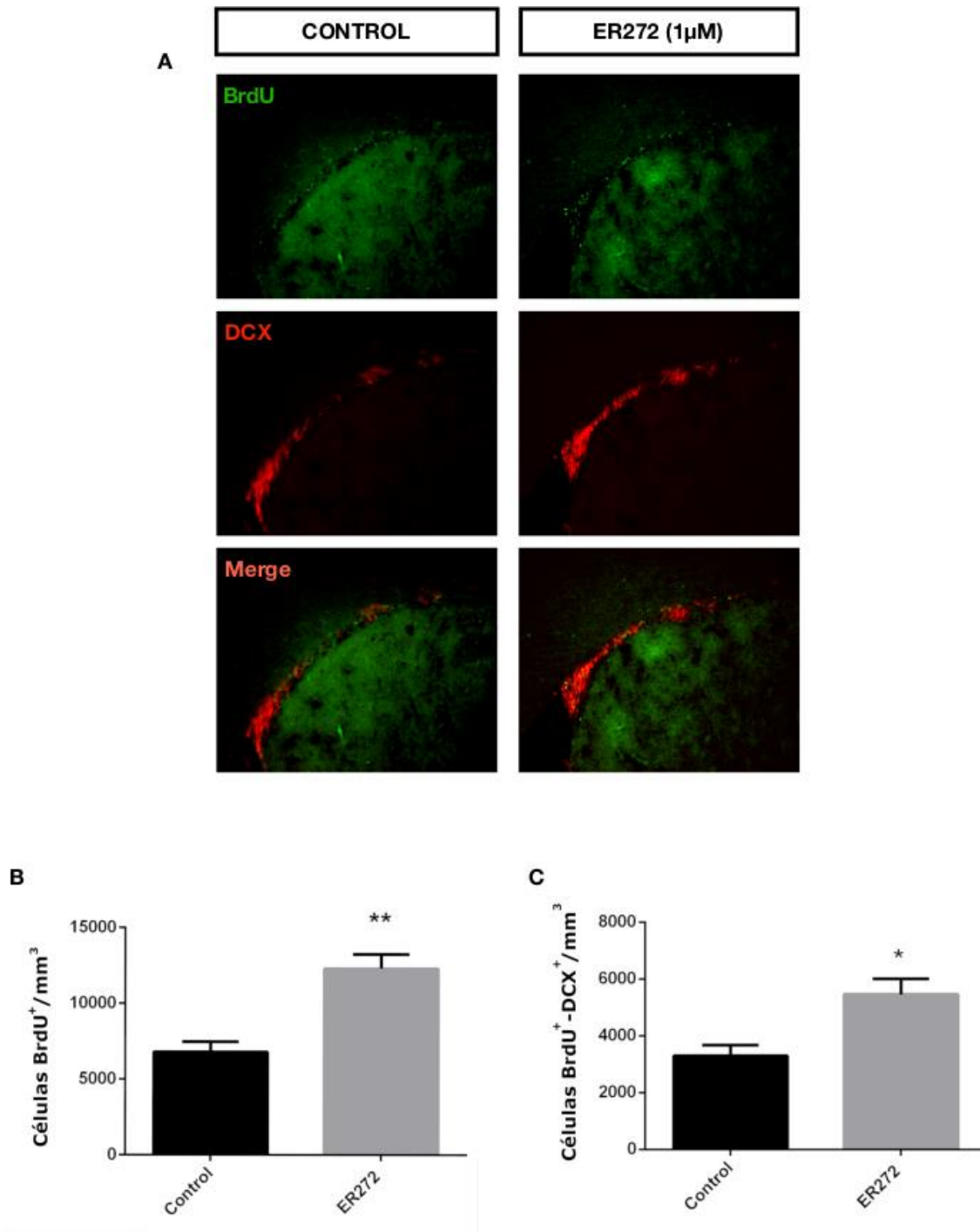


Ilustración 7: La administración intranasal de ER272 estimula la neurogénesis en la SVZ. **A)** Fotomicrografías al microscopio de fluorescencia de dos secciones coronales representativas de la SVZ del cerebro de dos ratones adultos sanos (una del grupo control, y otra del grupo tratado con ER272 [1 μ M]), pasados los 7 días de tratamiento. Las secciones fueron posteriormente procesadas por técnicas de inmunohistoquímica para la detección de los marcadores DCX y BrdU. Este último fue administrado concomitantemente al tratamiento intranasal, a través de inyecciones intraperitoneales en días alternos, incorporándose a los núcleos en proliferación. **B)** Este gráfico representa el total de células BrdU⁺ (células en proliferación) por mm³ tras 7 días de tratamiento. Puede observarse un aumento significativo de la proliferación celular en los ratones tratados con ER272 (1 μ M) en comparación con el grupo control. **C)** El gráfico nos compara la proporción de células que co-expresan los marcadores BrdU y DCX por mm³, esto es, el número de células que, siendo BrdU+, también expresaron DCX y, por tanto, son neuroblastos, por unidad de volumen; puede observarse que existen diferencias significativas entre ambos grupos, siendo la tasa de neurogénesis mayor en el grupo tratado con ER272 en comparación con el grupo control. Nota: * equivale a estadísticamente significativo con $p < 0,05$.

7.3 La administración intranasal de ER272 no estimula la formación de glioblastos en la SVZ

Con el fin de valorar si se estimuló la gliogénesis en los nichos neurogénicos estudiados, se procedió a realizar una técnica de inmunohistoquímica con el marcador de células gliales GFAP en aquellos cortes que contenían SVZ (los mismos a los que se les realizó el marcaje con BrdU). Para poder discernir correctamente ambos marcadores, se utilizaron anticuerpos secundarios diferentes, conjugados con fluoróforos de distinto color. Dado que la GFAP es una proteína que se une al citoplasma de las células gliales, una de las formas de saber si la célula que estamos cuantificando es un glioblasto es mediante la superposición de las imágenes BrdU y GFAP, valorando de esta manera qué proporción de células expresaron ambos marcadores, así como el área de expresión de GFAP en el grupo tratado con ER272, comparado con el grupo control.

Como puede observarse en la Ilustración 8, el tratamiento con ER272 (1 μ M) intranasal durante 7 días no varió el número de células GFAP⁺-BrdU⁺ en la SVZ de ratones adultos sanos, en comparación con los que fueron tratados únicamente con vehículo. Esto se traduce a que el tratamiento con ER272 no afecta a la gliogénesis en esta región.

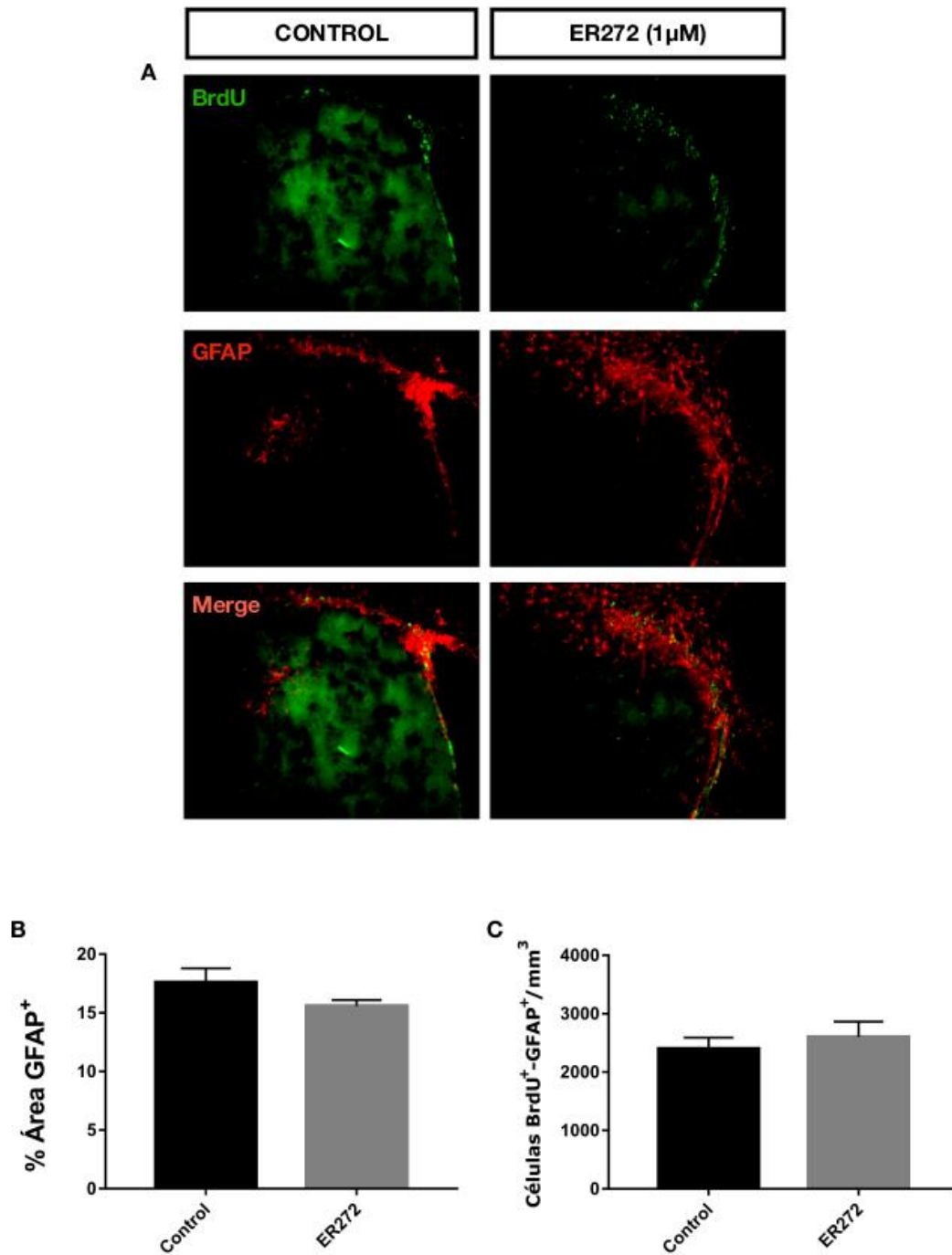


Ilustración 8: La administración intranasal de ER272 no promueve la gliogénesis en la SVZ. A) Fotomicrografías al microscopio de fluorescencia que muestran dos secciones coronales representativas de la SVZ del cerebro de dos ratones adultos sanos (uno tratado con vehículo, y otro con ER272 [1 μ M]) tras 7 días de tratamiento. Se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para marcar las células que co-expresaron BrdU y GFAP. **B)** Este gráfico representa el área de GFAP con respecto al área total de la sección. Al comparar el grupo control con el tratado con ER272, puede observarse que no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. **C)** Número total de células que co-expresaron ambos marcadores (BrdU y GFAP), esto es, que eran glioblastos. A la comparación de los resultados entre los dos grupos, podemos observar que no existieron diferencias significativas en lo que atañe a la gliogénesis.

7.4 La administración intranasal de ER272 no estimula la proliferación en el DG del hipocampo

De forma análoga al estudio de la proliferación en la SVZ, para estudiar el efecto de la administración intranasal de ER272 (1 μ M) sobre este parámetro en el DG del hipocampo en el cerebro de ratones adultos sanos, se utilizó el marcador BrdU, un análogo de la timidina que se une a núcleos en proliferación.

Como puede observarse más adelante (Ilustración 9 A-B), no se observaron cambios en la proliferación en el grupo tratado con ER272 en comparación con el vehículo. Este resultado únicamente nos sugiere que el compuesto ER272 no estimula la proliferación en el DG del hipocampo; no nos aclara si existe diferenciación celular, ni hacia qué fenotipo. Para ello se utilizaron los marcadores GFAP y DCX.

7.5 La administración intranasal de ER272 estimula la formación de neuroblastos en el DG del hipocampo

Para valorar la neurogénesis en el DG del hipocampo, se procedió de igual modo que en la SVZ. En esta ocasión, se realizaron secciones coronales que contuviesen este nicho neurogénico, y se marcaron las células por medio de una técnica de inmunohistoquímica. Los marcadores utilizados fueron BrdU para detectar núcleos proliferantes, y DCX, un marcador de microtúbulos específico de precursores neuronales. De este modo, se considerarían neuroblastos aquellas células que co-expresasen ambos marcadores.

En la Ilustración 9 se refleja que en los ratones tratados con ER272 (1 μ M) se observó un aumento de las células con doble marcaje DCX⁺-BrdU⁺, pero sin un aumento significativo en la proliferación celular. Este resultado sugiere que el compuesto ER272 ejerce un efecto a favor de la diferenciación neuronal en el DG del hipocampo, sin alterar la tasa de proliferación neural en esta región.

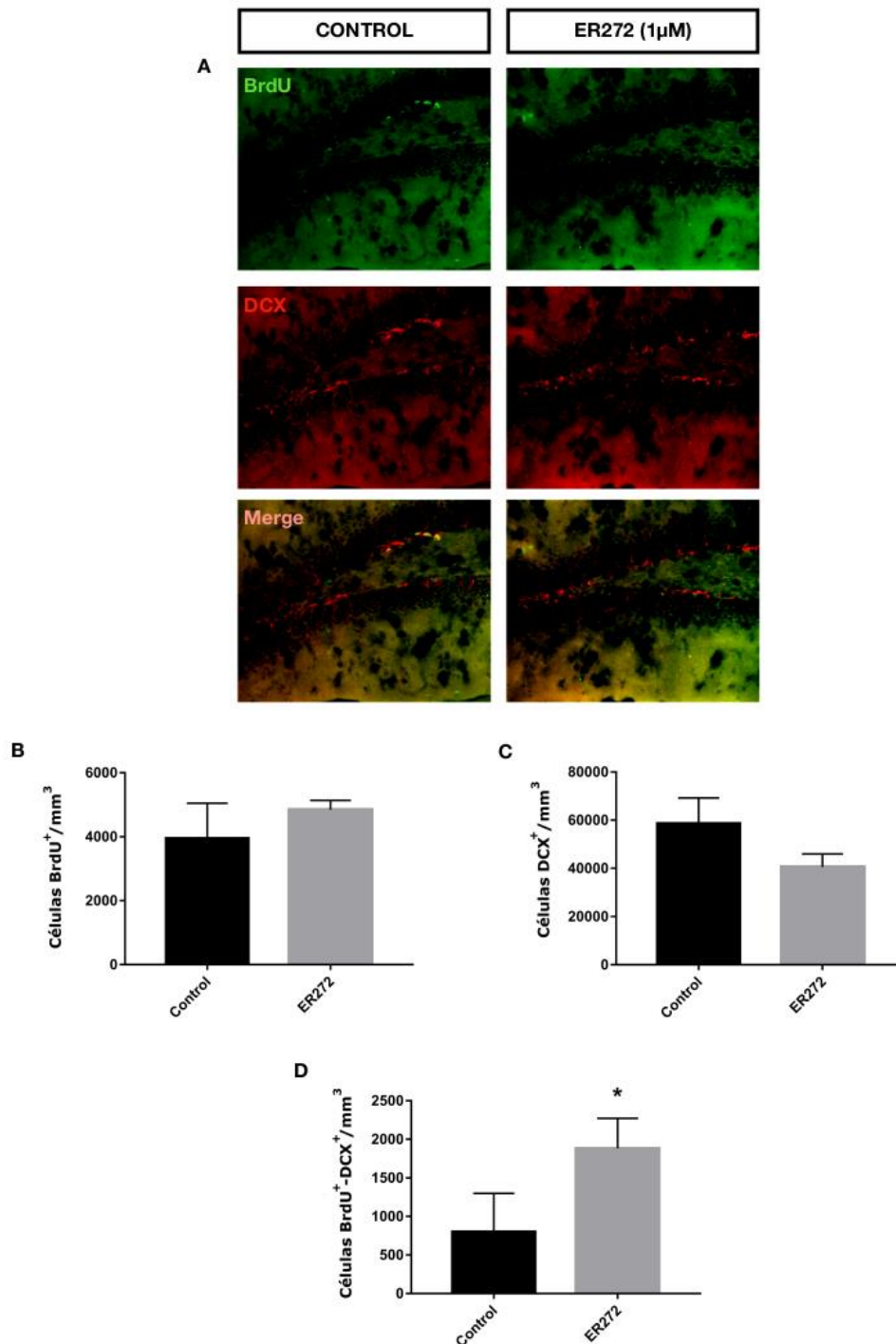


Ilustración 9: La administración intranasal de ER272 estimula la neurogénesis en el DG del hipocampo. A) Fotomicrografías al microscopio de fluorescencia que muestran dos secciones del DG del hipocampo en dos ratones adultos sanos: uno tratado con vehículo, y otro con ER272 (1 μ M); ambos tras 7 días de tratamiento. Pasada la fase de tratamiento, se realizó una inmunohistoquímica para marcar las células que expresaron tanto BrdU como DCX. **B)** Número total de células BrdU⁺ comparando ambos grupos; se puede observar que no hubo cambios significativos respecto a la proliferación en aquellos tratados con ER272. **C)** El gráfico representa el número total de células DCX⁺ por unidad de volumen tras el tratamiento con ER272 o vehículo. **D)** Células con doble marcaje BrdU-DCX por unidad de volumen; se puede observar que hubo un aumento significativo en el grupo tratado con ER272, en comparación con el vehículo. Nota: * significa estadísticamente significativo con $p < 0,05$.

7.6 La administración intranasal de ER272 no estimula la formación de glioblastos en el DG del hipocampo

Con el propósito de estudiar si, tras 7 días de tratamiento con ER272 (1 μ M), había un aumento de la gliogénesis en el DG del hipocampo (en comparación con el grupo control tratado con vehículo), se procedió a realizar una inmunohistoquímica para marcar aquellas células que co-expresasen tanto BrdU como GFAP, mismo procedimiento que se realizó en la SVZ.

En la Ilustración 10 podemos observar que el tratamiento con ER272 no sólo no estimula la gliogénesis a nivel del DG del hipocampo, sino que más bien parece disminuirla. Esto se puede traducir en que la molécula ER272 podría comportarse como un inhibidor de la gliogénesis a este nivel, o bien que promueve la migración glial a otras regiones del SNC, sin alterar la tasa de gliogénesis en el nicho.

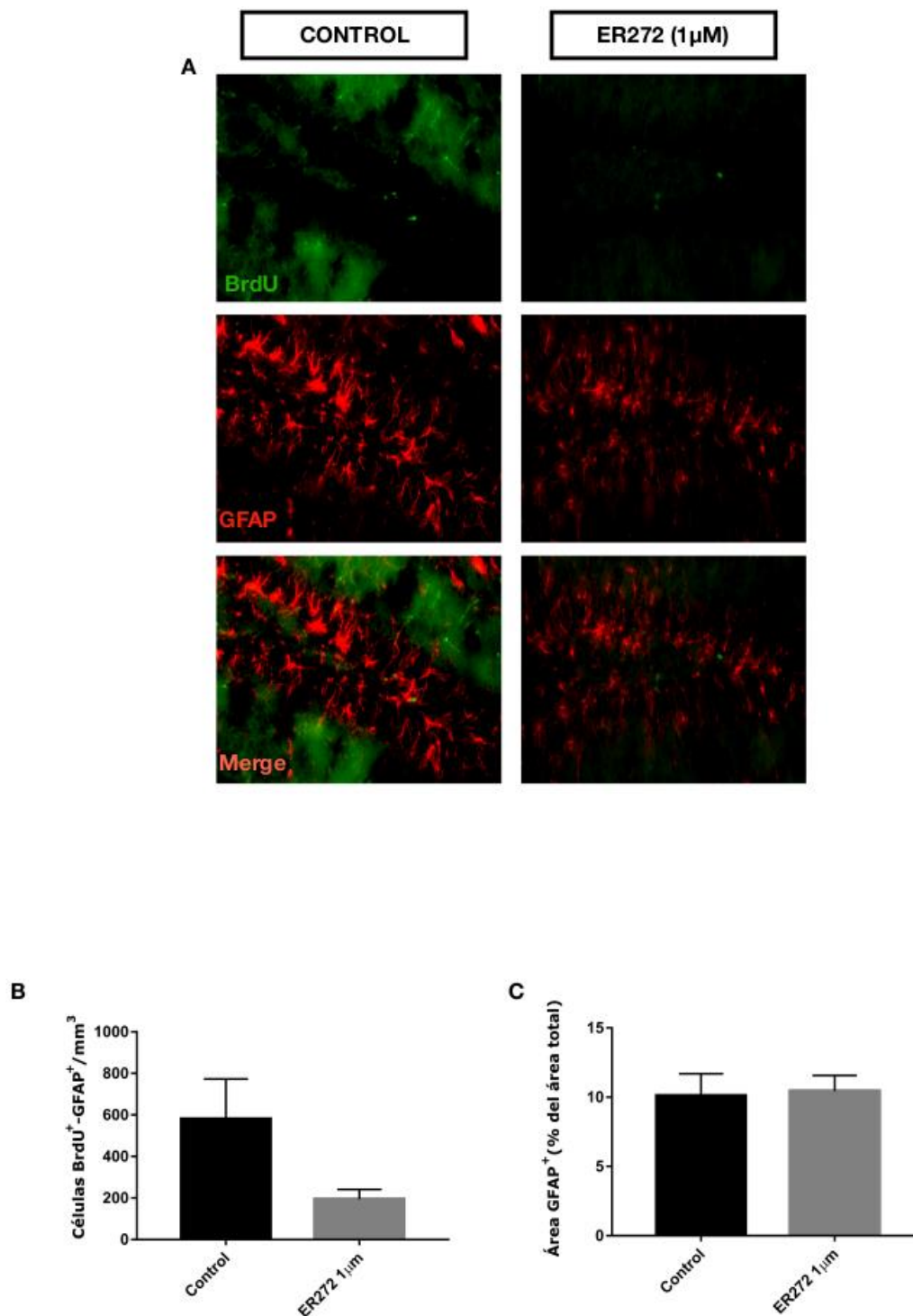


Ilustración 10: La administración intranasal de ER272 no estimula la gliogénesis en el DG del hipocampo. A) Fotomicrografías al microscopio de fluorescencia en las que se ven dos secciones coronales representativas del DG del hipocampo del cerebro de 2 ratones adultos sanos (uno tratado con ER272 (1 μ M) intranasal, y el otro tratado con vehículo) tras 7 días de tratamiento. Tras la fase de tratamiento se realizó una inmunohistoquímica con doble marcaje de BrdU y GFAP. **B)** Número de células con co-expresión BrdU-GFAP por unidad de volumen. En este gráfico se muestra que en los ratones tratados intranasalmente con ER272 se observó una menor tasa de gliogénesis en comparación con el grupo control. **C)** Área total de expresión del marcador GFAP en comparación con el área total de la sección. En este gráfico podemos observar que no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

8. DISCUSIÓN

Actualmente existe una gran variedad de situaciones que cursan con una pérdida irreversible de neuronas en el SNC. Enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer, o incluso las secuelas de accidentes cerebrovasculares o traumatismos medulares, son entidades cada vez más prevalentes, con un gran impacto en la sociedad, y para las cuales no existe un tratamiento eficaz. Es por ello que cada vez urge más la búsqueda de alternativas terapéuticas.

En el cerebro adulto existe una reposición neuronal fisiológica que acontece a partir de células madre neurales (NSC) en regiones específicas del SNC, denominadas nichos neurogénicos: SVZ y DG del hipocampo, principalmente^{8,9}. En estas regiones, las NSC, células multipotenciales e inicialmente quiescentes, para ser activadas, han de ser sometidas a influjos moleculares que activen vías de señalización intracelulares que les permitan generar, mediante división asimétrica, progenitores neurales (NPC), precursores multipotenciales con la capacidad de diferenciarse a neuroblastos o glioblastos, determinando de esta forma la naturaleza del linaje celular; para hablar de neurogénesis, es preciso que las NPC se diferencien hacia neuroblastos, y éstos a neuronas maduras funcionales^{4,6}.

Existen diversas vías que intervienen en la neurogénesis (Notch, BMPs, GABA, Wnt, IGFs, EGF, TGF α ...), una de ellas es la vía de las PKC^{3,4,9}. Dentro de esta familia encontramos diversas isoenzimas, cada una con una función distinta sobre el proceso de neoformación celular: por ejemplo, las PKC atípicas, durante el desarrollo del SNC, se conoce que están involucradas en la transición de las NSC hacia neuronas; mientras que, en la edad adulta, se conoce que PKC noveles, concretamente la PKC ϵ , están involucradas en la diferenciación de las NPC hacia astrocitos^{3,23,40}.

Los diterpenos son moléculas que activan las vías de las PKC clásicas y noveles gracias a su mimetismo molecular con el DAG (activador fisiológico de las PKC). De ellos el más famoso es el PMA, conocido además por su actividad tumorigénica^{25,26}.

Estudios previos de nuestro equipo de investigación demostraron que diterpenos no oncogénicos como la prostratina o el ER272 (implicado en este estudio), promueven la neurogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (mediante administración i.c.v)³.

La finalidad de este estudio fue encontrar nuevas vías de administración no invasivas que permitiesen atravesar la BHE logrando una biodisponibilidad óptima. En nuestro caso, nos centramos en la vía intranasal.

Con el fin de probar si la administración intranasal de ER272 era capaz de promover la neurogénesis, lo administramos por dicha vía a ratones adultos sanos durante 7 días, junto con una inyección intraperitoneal de BrdU en días alternos, que se fijaría a las células en proliferación, coincidiendo la última inyección con el último día de tratamiento. Una vez finalizada la fase de tratamiento, los ratones sacrificados y los cerebros procesados, se realizaron secciones coronales de territorios que contuviesen SVZ y DG del hipocampo, a las que se les realizó técnicas de inmunohistoquímica para marcar células que expresasen BrdU, GFAP y DCX, con la finalidad de, al cuantificarlas, valorar comparativamente con el grupo control la proliferación celular, neurogénesis y gliogénesis.

En la SVZ se observó un aumento significativo en el número de células BrdU⁺ por unidad de volumen en el grupo tratado con ER272, en comparación con el control. Este resultado nos llevó a la conclusión de que el compuesto estudiado favorece la proliferación celular en la SVZ (Ilustración 7 A, B). Seguidamente, al cuantificar las células con doble marcaje DCX⁺-BrdU⁺ por unidad de volumen, nos percatamos de que, además, hubo un aumento significativo en la formación de neuroblastos en el grupo tratado con ER272, en comparación con el grupo control. Es decir, las nuevas células que se formaron (BrdU⁺) eran neuroblastos (DCX⁺-BrdU⁺), con lo que podemos afirmar que el compuesto ER272 favorece la neurogénesis en la SVZ (Ilustración 7 A, C).

Por otra parte, para valorar si hubo o no gliogénesis en la SVZ, se cuantificaron tanto las células con doble marcaje GFAP⁺-BrdU⁺ por unidad de volumen, como el porcentaje de la sección que marcaba GFAP. Se compararon los resultados entre los grupos de

tratamiento, sin observarse diferencias significativas entre ambos, esto es, el compuesto ER272 no fomentaba la gliogénesis en la SVZ (Ilustración 8 A-C).

Finalmente, para analizar los efectos de la administración intranasal de ER272 sobre el DG del hipocampo, se realizaron los mismos procedimientos que los mostrados anteriormente en la SVZ. En el grupo tratado con ER272 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de células BrdU⁺, lo que significa que el compuesto estudiado no altera la tasa de mitosis en el DG del hipocampo (Ilustración 9 A, B). La cuantificación de células con doble marcaje DCX⁺-BrdU⁺ reveló, no obstante, un aumento significativo del número de células doble positivas en el grupo tratado con ER272, pero sin alterar el número de células DCX⁺ (Ilustración 9 A, C, D). A la vista de los resultados, se concluyó que el compuesto ER272 no estimula la proliferación celular en el DG del hipocampo, pero sí promueve la diferenciación de precursores neurales hacia fenotipo neuronal y, por tanto, la neurogénesis.

Al analizar los datos respectivos a la gliogénesis en el DG del hipocampo, se observó una disminución significativa de células BrdU⁺-GFAP⁺ en el grupo tratado con ER272 comparado con el control (Ilustración 10 A, B). No obstante, no hubo diferencias significativas entre los grupos en lo que concierne al porcentaje de área marcada con GFAP (Ilustración 10 C). Esto nos sugiere que el compuesto ER272 inhibe la gliogénesis en el DG del hipocampo. Estos resultados, junto con los observados anteriormente en la Ilustración 9, revelaron que el compuesto ER272 no altera la tasa de proliferación en el DG del hipocampo, y que ejerce su efecto promoviendo la diferenciación de los precursores neurales hacia fenotipo neuronal, inhibiendo de esta forma la gliogénesis.

9. CONCLUSIONES

1. La administración intranasal de ER272 favorece la neurogénesis en la SVZ del cerebro de ratones adultos sanos.
2. En la SVZ, la administración intranasal de ER272 no tiene efecto sobre la gliogénesis.
3. En el DG del hipocampo, el compuesto ER272 favorece la diferenciación hacia fenotipo neuronal, pero sin alterar la tasa de proliferación.
4. El compuesto ER272 parece tener un efecto inhibitorio sobre la gliogénesis en el DG del hipocampo, al observarse una disminución significativa de células doble positivas GFAP⁺-BrdU⁺.

10. BIBLIOGRAFÍA

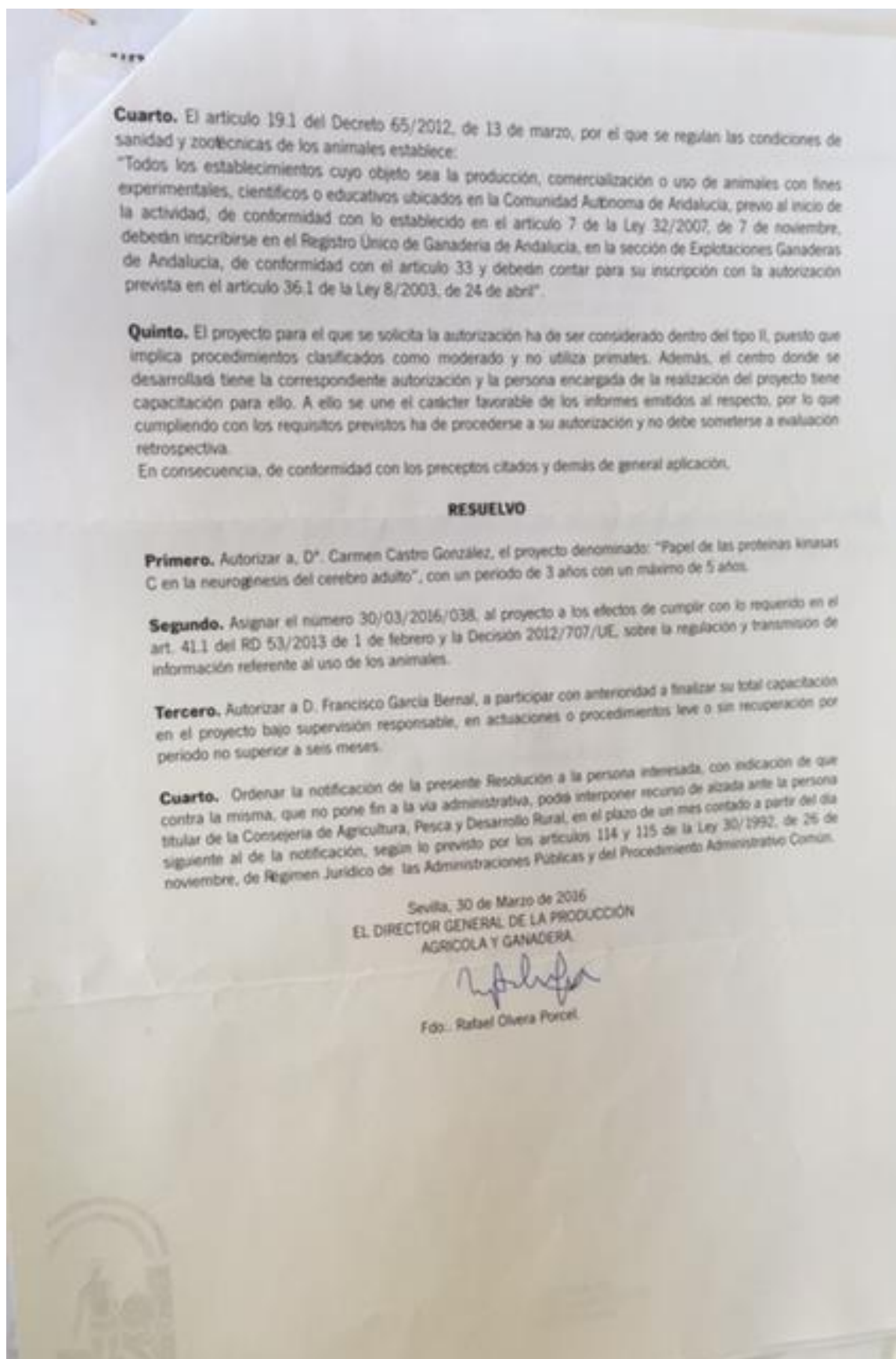
1. Jin X. The role of neurogenesis during development and in the adult brain. Vol. 44, *European Journal of Neuroscience*. 2016. p. 2291–9.
2. Feliciano DM, Bordey A, Bonfanti L. Noncanonical sites of adult neurogenesis in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(10).
3. Geribaldi-Doldán N, Flores-Giubi E, Murillo-Carretero M, García-Bernal F, Carrasco M, Macías-Sánchez AJ, et al. 12-Deoxyphorbols Promote Adult Neurogenesis by Inducing Neural Progenitor Cell Proliferation via PKC Activation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015 Jul 29;19(1):1–14.
4. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *J Neurosci*. 2002;22(3):629–34.
5. Annenkov A. Receptor tyrosine kinase (RTK) signalling in the control of neural stem and progenitor cell (NSPC) development. Vol. 49, *Molecular Neurobiology*. 2014. p. 440–71.
6. Fawal MA, Davy A. Impact of Metabolic Pathways and Epigenetics on Neural Stem Cells. *Epigenetics Insights*. 2018;11.
7. Kulkarni A, Ganesan P, O'Donnell LA. Interferon gamma: Influence on neural stem cell function in neurodegenerative and neuroinflammatory disease. Vol. 2016, *Clinical Medicine Insights: Pathology*. 2016. p. 9–19.
8. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 2004;41(5):683–6.
9. Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(November):1–19.
10. Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol*. 2001;172(1):1–16.
11. Kokoeva M V, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*. 2005;310(5748):679–83.
12. Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, et al. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol*. 2005;192(2):251–64.
13. Matsuzaki K, Katakura M, Hara T, Li G, Hashimoto M, Shido O. Proliferation of

- neuronal progenitor cells and neuronal differentiation in the hypothalamus are enhanced in heat-acclimated rats. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2009;458(4):661–73.
14. Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol*. 2005;168(3):415–27.
 15. Bonfanti L, Peretto P. Adult neurogenesis in mammals - a theme with many variations. *Eur J Neurosci*. 2011;34(6):930–50.
 16. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965;124(3):319–35.
 17. Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science*. 1996;271(5251):978–81.
 18. Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4752–7.
 19. Etchegaray J-P, Mostoslavsky R. Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. *Mol Cell*. 2016 Jun;62(5):695–711.
 20. Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*. 1995;6(5):474–86.
 21. Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KK V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(12):937–57.
 22. Wang J, Gallagher D, Devito LM, Cancino GI, Tsui D, He L, et al. Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. *Cell Stem Cell*. 2012;11(1):23–35.
 23. Steinhart R, Kazimirsky G, Okhrimenko H, Ben-Hur T, Brodie C. PKCepsilon induces astrocytic differentiation of multipotential neural precursor cells. *Glia*. 2007;55(2):224–32.
 24. Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*. 1998;332 (Pt 2):281–92.
 25. Goel G, Makkar HP, Francis G, Becker K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol*. 2007;26(4):279–88.

26. Deleers M, Malaisse WJ. Binding of tumor-promoting and biologically inactive phorbol esters to artificial membranes. *Cancer Lett.* 1982;17(2):135–40.
27. Gonzalez-Marrero I, Hernández-Abad LG, Castañeyra-Ruiz L, Carmona-Calero EM, Castañeyra-Perdomo A. Variaciones de los plexos coroideos y las barreras cerebrales en la hipertensión arterial y el envejecimiento. *Neurología.* 2018 Jul.
28. Bueno D, Garcia-Fernández J. Evolutionary development of embryonic cerebrospinal fluid composition and regulation: An open research field with implications for brain development and function. *Fluids Barriers CNS.* 2016;13(1):1–12.
29. Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. The Choroid Plexus-Cerebrospinal Fluid System: From Development to Aging. In: *Current Topics in Developmental Biology.* 2005. p. 1–52.
30. Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, et al. The Cerebrospinal Fluid Provides a Proliferative Niche for Neural Progenitor Cells. *Neuron.* 2011 Mar;69(5):893–905.
31. O’Leary JD, Hoban AE, Murphy A, O’Leary OF, Cryan JF, Nolan YM. Differential effects of adolescent and adult-initiated exercise on cognition and hippocampal neurogenesis. *Hippocampus.* 2018.
32. Feliciano DM, Zhang S, Nasrallah CM, Lisgo SN, Bordey A. Embryonic cerebrospinal fluid nanovesicles carry evolutionarily conserved molecules and promote neural stem cell amplification. *PLoS One.* 2014;9(2):1–10.
33. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 2015;282(21):4067–79.
34. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):13–25.
35. Dhuria S V., Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. Vol. 99, *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2010. p. 1654–73.
36. Chapman CD, Frey WH, Craft S, Danielyan L, Hallschmid M, Schiöth HB, et al. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm Res.* 2013;30(10):2475–84.
37. Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH. Delivery of insulin-like growth

- factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*. 2004 Jan 1 [cited 2018 May 15];127(2):481–96.
38. Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA. Awake Intranasal Insulin Delivery Modifies Protein Complexes and Alters Memory, Anxiety, and Olfactory Behaviors. *J Neurosci*. 2009;29(20):6734–51.
 39. McGrath JC, McLachlan EM, Zeller R. Transparency in research involving animals: The Basel declaration and new principles for reporting research in BJP manuscripts. *Br J Pharmacol*. 2015;172(10):2427–32.
 40. Geribaldi-Doldán N, Díez-Salguero M, Castro C, García-Bernal F, Verástegui C, Carrasco M, et al. Protein Kinase C Inhibition Mediates Neuroblast Enrichment in Mechanical Brain Injuries. *Front Cell Neurosci*. 2018;12(November):1–17.

11. ANEXO



Certificado de aprobación del proyecto por el Comité Ético de Experimentación Animal